

**Enzimas de biotransformação
em tilápia (*Oreochromis
niloticus*) exposta ao hormônio
natural 17 β -estradiol**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 61

Enzimas de biotransformação em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao hormônio natural 17 β -estradiol

Franciele de O. Bitencourt
Rosa T. S. Frighetto
Julio F. de Queiroz
Marcos E. Losekann
Alfredo J. B. Luiz
Eduardo Alves de Almeida
Júlio César P. Palhares

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 Km 127,5 - Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

CEP 13820-000 Jaguariúna, SP

Fone: (19) 3311-2650

Fax: (19) 3311-2640

<http://www.cnpma.embrapa.br>

sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Marcelo Augusto Boechat Morandi*

Secretária-Executiva: *Vera Lúcia S. S. de Castro*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecário: *Victor Paulo Marques Simão*

Membro Nato: *Adriana M. M. Pires*

Membros: *Lauro Charlet Pereira, Fagoni Fayer Calegario, Aline de Holanda Nunes Maia, Nilce Chaves Gattaz, Marco Antonio Ferreira Gomes e Rita Carla Boeira*

Normalização bibliográfica: *Maria de Cleófas Faggion Alencar*

Editoração eletrônica: *Alexandre Rita da Conceição*

Revisão de texto: *Nilce Chaves Gattaz*

1ª edição eletrônica (2011)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente

Bitencourt, Franciele de O.

Enzimas de biotransformação em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao hormônio natural 17 β -estradiol / Franciele de O. Bitencourt ...[et al.]. – Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2011.

32 p.— (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente; 61).

1. Biomarcador 2. Estrógeno 3. Tilápia. I. Bitencourt, Franciele de O. II. Frighetto, Rosa T. S. III. Queiroz, Julio F. de. IV. Losekann, Marcos E. V. Luiz, Alfredo J. B. VI. Almeida, Eduardo Alves de. VII. Palhares, Júlio César P. VIII. Título. IX. Série.

CDD 551.48

© Embrapa 2011

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução	9
1.2 Uso de dejetos de animais na piscicultura	10
1.3 Enzimas de biotransformação	13
2. Objetivo.....	14
3. Material e Métodos	15
3.1 Animais.....	15
3.2 Exposição.....	15
3.2.1. Hormônio 17 β -estradiol	15
3.2.2. Desenho Experimental.....	16
3.3 Processamento das amostras.....	16
3.4 Avaliação da atividade do Citocromo P450	16
3.5 Quantificação de proteínas.....	17
3.6 Avaliação da GST	17
3.7 Quantificação de estrógenos nas amostras de água dos sistemas de produção	17
4. Resultados e Discussão.....	18
4.1 Indução do CYP450	19
4.2 Indução da GST	22
4.3 Quantificação de 17 β -estradiol e estrona nas amostras de campo.....	24
5. Conclusão e Recomendação	26
6. Agradecimentos.....	27
Referências.....	28

Enzimas de biotransformação em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao hormônio natural 17 β -estradiol

Franciele de O. Bitencourt¹

Rosa T. S. Frighetto²

Júlio F. de Queiroz³

Marcos E. Losekann⁴

Alfredo J. B. Luiz⁵

Eduardo Alves de Almeida⁶

Júlio César P. Palhares⁷

Resumo

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos vêm recebendo maior atenção pela atividade biológica que eles apresentam. Essa resposta biológica é atribuída à melhor conformação reconhecida pelos receptores, resultando em respostas máximas. Os estrógenos são também considerados responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela sua presença nos organismos do ecossistema aquático. O hormônio 17 β -estradiol é produzido por vertebrados na fase reprodutiva do seu desenvolvimento e sua presença tem sido detectada nas águas superficiais. O objetivo do estudo foi avaliar a causa-efeito da exposição da tilápia ao hormônio 17 β -estradiol através da análise de

¹Química Ambiental, Especialista em Engenharia da Qualidade Integrada, Estagiária da Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP.

²Química, Doutora em Química Orgânica, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. rosa@cnpma.embrapa.br

³Oceanólogo, Doutor em Ciências Agrárias, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. jqueiroz@cnpma.embrapa.br

⁴Zootecnista, Mestre em Zootecnia, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. melosekann@cnpma.embrapa.br

⁵Engenheiro Agrônomo, Doutor em Sensoriamento Remoto, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, Km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. alfredo@cnpma.embrapa.br

⁶Biólogo, Doutor em Bioquímica, Professor Assistente, Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho.

⁷Graduado em Zootecnia, Doutor em Ciências Ambientais, Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234 - Caixa Postal 339, 13.560-970, São Carlos, SP. palhares@cppe.embrapa.br.

enzimas de biotransformação no fígado e brânquias; complementado com a quantificação de 17 β -estradiol e estrona em amostras de águas advindas dos viveiros integrados com a produção de suínos. Este estudo foi conduzido em condições de laboratório, em delineamento totalmente casualizado, com três níveis de concentração do hormônio 17 β -estradiol (E2) (0, 5, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$). Após 7 dias de exposição, fígados e brânquias foram extraídos para análise da atividade de três isoformas de citocromo P450: EROD, BROD, PROD e a atividade de Glutathione S-Transferase (GST). Os resultados mostraram que a atividade de EROD (CYP1A), comumente induzida no metabolismo de substâncias aromáticas, não apresentou diferença estatística entre os diferentes tratamentos de E2, indicando que o hormônio não exerce indução desta isoforma nos peixes, nas concentrações e tempo de exposição testados. A atividade da PROD foi significativamente alterada nos dois tratamentos de E2 em comparação ao controle. Esse resultado pode indicar um papel importante desta atividade no metabolismo do E2 presente na água. Com relação à atividade da BROD, pode-se notar que houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e os dois grupos tratados com o E2. Pelo fato de duas ou mais isoformas de CYP poderem contribuir para o metabolismo de um único composto, a BROD pode ser considerada como outro biomarcador da presença de 17 β -estradiol na água superficial. A análise de variância do experimento confirmou a existência do efeito de E2 estatisticamente significativo sobre a atividade enzimática (GST) nos fígados dos peixes, com grau de significância superior a 90% (Prob > F = 0,0753). Além disso, foi possível observar que os valores das atividades de GSTs das brânquias e fígados dos peixes-controle e tratados seguem uma tendência, isto é, a atividade enzimática das brânquias aumenta conforme o aumento da atividade no fígado. O 17 β -estradiol esteve presente em concentrações quantificáveis nos pontos amostrados, estando esses valores dentro das concentrações encontradas por outros autores em outras localidades do Brasil. Esses valores são muito maiores que a concentração mínima para apresentar algum efeito observável (10 ng L⁻¹), descrito em literatura.

Palavras-chave: Biomarcadores, 17 β -estradiol, Tilápia

Biotransformation enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to natural hormone 17 β -estradiol

Abstract

Among the sexual hormones the estrogens are receiving major attention due to their biological activity. Such biological response is attributed to the best conformation recognized by their receptors, resulting in maximum responses. The estrogens are also considered responsible for most of disruptor's effects caused by their presence in aquatic ecosystems. The 17 β -estradiol hormone is produced by vertebrates during the reproductive phase of their lives and its presence has been detected in superficial waters. The objective of this study was to evaluate the cause-effect of tilapia exposition to the hormone 17 β -estradiol through the analysis of biotransformation enzymes in liver and gills, complemented with the quantification of 17 β -estradiol and estrone in water samples collected from fish ponds integrated to swine production. The present study was conducted under laboratory conditions, in a randomized experimental design with three levels of 17 β -estradiol (E2) (0, 5, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$), with three replicates. After 7 days of exposure time, liver and gills were extracted to analyze three isoforms of cytochrome P450: EROD, BROD, PROD and the activity of Glutathione S-Transferase (GST). The results showed that the EROD activity (CYP1A), normally induced by the metabolism of aromatic compounds, did not present statistical differences among the treatments exposed to E2, what means that the hormone did not induce isoform 1A in fish under these particular experimental conditions. PROD activity was significantly altered in both concentrations, by means of 5 and 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, when compared

to control. This result can indicate an important role of PROD on the metabolism of E2 present in water. Regarding to the BROD activity, it could be observed differences statistically significant between control and both groups of treatments. Two or more CYP isoforms can contribute to the metabolism of the same compound, what makes BROD a candidate as a next bioindicator of the exposure to E2 in aquatic ecosystems. Analysis of variance could confirm the effect of E2 statistically significant on the GST activity in liver tissues with >90% of significance ($\text{Prob} > F = 0.0753$). Furthermore, it was possible to observe that the values of GSTs activities in liver and gills in both, control and treatments, follow a tendency, that means, enzymatic activity in gills increase as the increasing of the activity in the liver tissues. In this study, the 17 β -estradiol was found in measurable concentrations in three sampled points, and these values were similar to the findings of other authors at different locations in Brazil. In addition, those values are much higher than the minimum concentration that presented observable effects (10 ng L⁻¹).

Keywords: Biomarkers, 17 β -estradiol, Tilapia

Introdução

Segundo dados do IBAMA revisados por Boscardin (2008), a partir de 2002 a produção de camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei* passou a liderar a produção aquícola nacional e, nesse mesmo ano, a produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*) ultrapassou a da carpa. De acordo com dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010, a produção de tilápia no Brasil apresenta um crescimento contínuo desde 1994. Entre os anos 2003 a 2009, a produção de tilápia cresceu 105%, saindo de 64.857,5 toneladas para 132.957 t, respectivamente.

A tilápia-do-Nilo, dentre as espécies mais cultivadas no Brasil, é a que apresenta maior resistência às variações ambientais e à qualidade da água, como a temperatura, turbidez, pH, oxigênio dissolvido e amônia. Além disso, ela se destaca pela rusticidade, crescimento rápido, coloração clara da carne e adaptabilidade ao confinamento. A tilápia tem o hábito alimentar onívoro e aceita rações com grande facilidade, desde pós-larva até a fase de terminação (BOSCOLOL et al., 2001) e, ocasionalmente, pode se alimentar de detritos depositados sobre os sedimentos no fundo dos viveiros (PATHIRATNE et al., 2009). Estas características tornam a tilápia uma espécie indicadora propícia para biomonitoramento da qualidade da água em ambientes tropicais (GOLD-BOUCHOT et al., 2006).

De acordo com a densidade de estocagem, das práticas de manejo adotadas e do uso dos insumos, a cria, recria e terminação de tilápias podem ser feitas nos sistemas extensivo, semi-intensivo, intensivo e super-intensivo. Em sistemas de cultivo em viveiros, uma das etapas mais importantes para o sucesso da produção é a escolha do local, seguida da construção e da preparação correta dos viveiros, as quais dependem diretamente das características da área. Geralmente, é preciso corrigir a acidez do solo por meio da calagem e, em alguns casos, também é preciso fertilizar os viveiros para promover o crescimento de alimento natural (fito e zooplâncton). Nesse sentido, a calagem e a adubação dos viveiros resultam, respectivamente, na

redução da acidez da água e na diminuição do estresse dos peixes e, ainda, contribuem diretamente para o crescimento adequado desses alimentos.

Com exceção do sistema de produção extensivo, que se caracteriza pelo uso de baixas densidades de estocagem e do uso de fertilizantes para promoção do crescimento de alimentos naturais nos viveiros, atualmente, muitos piscicultores que trabalham com outros sistemas de produção também têm utilizado fertilizantes na tentativa de reduzir os custos de produção decorrentes do uso de rações para os peixes. Em geral, nos viveiros de produção semi-intensivos são adotados os procedimentos de fertilização, que pode ser por via química ou orgânica. Os fertilizantes químicos utilizados são, geralmente, os mesmos utilizados na agricultura como, por exemplo, superfosfato triplo e uréia, sendo o fósforo e o nitrogênio os principais elementos utilizados. A fertilização orgânica é feita, geralmente, com esterco de animais (aves e suínos) que contêm nutrientes semelhantes aos fertilizantes químicos, porém em concentrações menores. A quantidade de fertilizantes a ser utilizada depende, principalmente, dos tipos de solo e do fertilizante (OSTRENSKY; BOEGER, 1998).

1.2 Uso de dejetos de animais na piscicultura

Dentre todos os sistemas de produção empregados na piscicultura nacional, os que vêm merecendo a maior atenção dos ambientalistas são os viveiros integrados, ou consorciados com a suinocultura. O sistema baseia-se na produção de peixes em policultivo (tilápia, carpas, jundiá) consorciada com a produção de suínos cujos dejetos servem como fonte de fertilização.

Neste sistema os peixes podem se alimentar dos dejetos de forma direta, aproveitando os nutrientes não digeridos; ou indireta, pela ação das bactérias sobre a matéria orgânica, transformando-a em nutrientes inorgânicos, o que favorece o desenvolvimento do fitoplâncton, que é a base alimentar para o zooplâncton e outros organismos que servem de alimento para os peixes (CECARELLI; FIGUEIRA, 2001). Portanto, se bem aproveitado, o sistema pode ser empregado como estratégia

produtiva para reduzir as concentrações de nitrogênio inorgânico com base no aporte de nitrogênio diário e na eficiência de retenção pelos organismos aquáticos.

Embora esse sistema apresente várias vantagens potenciais, como, por exemplo, baixo custo de produção, melhoria das condições de vida da família rural, geração de empregos e redução do êxodo rural, é preciso considerar alguns aspectos relevantes referentes à carga orgânica contida nos efluentes e à sanidade dos peixes produzidos nessas condições. No sistema de policultivo consorciado, com fertilização através de dejetos de suínos, apesar do aumento na produção piscícola, o fornecimento de matéria orgânica, se feito de forma incorreta, pode ocasionar piora na qualidade da água e prejudicar a saúde dos animais e dos seres humanos, com a presença de patógenos indesejáveis e danos à produção, além de poluição dos recursos naturais (OSTRENSKY; BOEGER, 1998).

Apesar de muitos especialistas acreditarem que este sistema de cultivo colabora com a melhoria da qualidade ambiental, estudos recentes mostraram que o sistema é potencialmente impactante para os parâmetros como amônia, fósforo total e coliformes termotolerantes (VALENTI, 2002; PALHARES, 2006). Mesmo com os avanços tecnológicos em relação à adubação orgânica de viveiros, muitas vezes os dejetos de animais contêm patógenos virais, bacterianos, protozoários e helmintos, que podem ser transmitidos ao homem por meio da água ou de organismos aquáticos, representando um risco para a saúde pública (AZEVEDO et al., 2006). As práticas piscícolas que possam garantir as Boas Práticas de Manejo (BPM) devem ser adotadas (BOYD et al., 2008), entre as quais a desinfecção e a limpeza periódica das instalações são fundamentais (EL-SHAFAI et al., 2004).

Além dessa possível presença de patógenos, sabe-se que todo vertebrado produz e elimina hormônios naturais, como os estrogênios, que são esteróides hormonais que regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e suas funções reprodutivas, e os androgênios, que são esteróides hormonais responsáveis pelo

desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas. Sendo assim, as concentrações são variáveis em função da idade, do estado de saúde, da dieta e do período de fertilidade, independente da classe de sexo (JOHNSON et al, 2000). Dentre esses hormônios sexuais, os estrógenos vêm recebendo maior atenção por serem compostos que apresentam atividade biológica extremamente elevada. Essa atenção se estende para o sistema de integração da piscicultura com outros animais (suínos e aves), pois nele há exposição direta às substâncias excretadas. [HYPERLINK "http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bf/Oestradiol-2D-skeletal.png"](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bf/Oestradiol-2D-skeletal.png)

Os estrógenos naturais 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e estrona (E1), e o estrógeno sintético 17 β -etinilestradiol (EE2) (Figura 1), são os que despertam maior preocupação, tanto pela potência como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas. Os mesmos são também considerados responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela sua presença no ambiente aquático (REIS FILHO, 2006). As características físico-químicas que mais influenciam no comportamento dessas substâncias são: a solubilidade em água, natureza hidrofóbica estimada pela constante de partição octanol: água, pressão de vapor e a constante de sorção (GHISELLI; JARDIM, 2007) (Tabela 1).

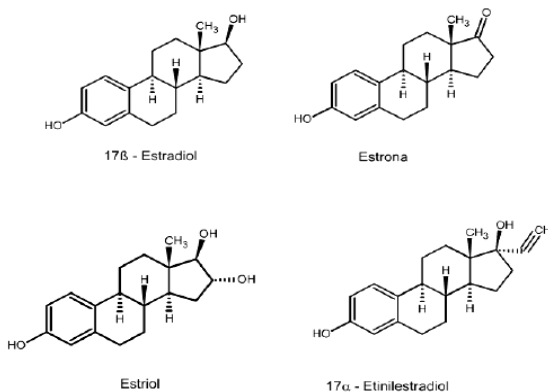


Figura 1. Estrutura química dos principais hormônios estrógenos.

Tabela 1. Características dos principais estrógenos (adaptado de Reis Filho, 2006).

Nome comum	Fórmula	γ_{sol} ($\mu\text{g L}^{-1}$ 25 °C)	Log K_{ow}	K_{oc}	Pressão de vapor (mm Hg)	Meia- Vida (dias)
17β-estradiol	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	12.960	4,01	3.300	$2,3 \times 10^{-10}$	0,2-9
Estrona	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$	12.420	3,13	4.882	$2,3 \times 10^{-10}$	2-3
Estriol	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$	13.250	2,45	1.944	$6,7 \times 10^{-15}$	NR
17α- etinilestradiol	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	483	3,67	4.770	$4,5 \times 10^{-11}$	4-6

γ_{sol} = solubilidade em água; K_{ow} = coeficiente de partição octanol:água; K_{oc} = constante de sorção; NR = não relatado

Outra característica marcante dos estrógenos no ambiente é o seu comportamento dose-resposta. Em contraste com as substâncias mais tóxicas, para as quais a resposta aumenta com a dose até tornar-se finalmente constante, as curvas correspondentes à ação de estrogênios e substâncias que mimetizam os estrogênios têm a forma de U. Os efeitos maiores são produzidos em doses mais baixas, sendo que as doses maiores desativam com certa intensidade o sistema de resposta. Além disso, certos compostos estrogênicos aumentam a atividade estrógena em alguns tecidos e bloqueiam em outros (BAIRD, 2002).

1.3 Enzimas de biotransformação

Em geral, alterações nos níveis e atividades de enzimas de biotransformação são biomarcadores de efeito mais sensíveis. Nos peixes, a atividade dessas enzimas pode ser induzida ou inibida sob exposição aos xenobióticos (BUCHELI; FENT, 1995). Indução da enzima significa um aumento na quantidade ou atividade dessas enzimas, ou ambas. A inibição é o oposto da indução. Neste caso, a atividade enzimática é bloqueada, possivelmente por meio da ligação forte ou formação de complexo entre a enzima e os inibidores. Dois principais tipos de enzimas envolvidas na biotransformação são distinguidos como enzimas da fase I e enzimas e co-fatores da fase II.

A fase I do metabolismo envolve oxidação, redução ou hidrólise, que são reações catalisadas por enzimas conhecidas como sistema oxidase de função mista, isto é, citocromo P450 [CYP450], citocromo b5 [cyb5] e NADPH citocromo P450 redutase [P450 RED]. Uma característica marcante desse sistema de enzimas está na sua atuação como facilitador da eliminação de compostos xenobióticos por meio do metabolismo de fase I, transformando compostos lipofílicos em compostos mais solúveis em água (BUCHELI; FENT, 1995). Os micropoluentes orgânicos hidrofóbicos podem induzir a atividade de enzimas de metabolização de xenobióticos em várias espécies de animais, inclusive nos peixes. O mecanismo de indução de enzima foi extensivamente estudado para as isoenzimas CYP450.

O metabolismo conhecido como de fase II envolve a conjugação do xenobiótico ou o seu metabólito com um ligante endógeno. Conjugações são reações de adição em que grupos grandes e, geralmente, polares, ou compostos como açúcares e aminoácidos, são adicionados por meio de ligação covalente aos compostos xenobióticos ou drogas. A maioria das enzimas de fase II catalisa estas reações de conjugação, facilitando a excreção desses compostos por meio da adição de grupos mais polares (p.ex. glutathione [GSH] e ácido glucurônico [GA]) às moléculas (COMMANDEUR et al., 1995; MULDER et al. 1990).

2. Objetivo

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) avaliar os efeitos do hormônio 17 β -estradiol nas atividades do citocromo P450 e de Glutathione S-transferases em tilápias-do-Nilo;
- 2) quantificar 17 β -estradiol e estrona em amostras de água coletadas em viveiros integrados com a produção de suínos.

O interesse no estudo foi avaliar as diferentes atividades bioquímicas

envolvidas para o entendimento dos efeitos de exposição ao hormônio 17β-estradiol e verificar o potencial de uso destas enzimas como biomarcadores de exposição. O hormônio 17β-estradiol, embora tenha sido encontrado em concentrações de poucos ng L⁻¹ na maioria dos estudos descritos anteriormente, no Brasil foi encontrado na água superficial em concentração de até 6 µg L⁻¹, justificando-se assim as concentrações testadas no presente estudo.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram cedidas pela unidade de pesquisa do Pólo Regional do Leste Paulista localizado em Monte Alegre do Sul, SP, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA). Os peixes foram transportados em cinco sacos plásticos de 40 L preenchidos com um terço de seu volume com água do próprio local e oxigênio (O₂) injetado. Em cada embalagem foram distribuídos 20 peixes e a mesma foi acondicionada, a temperatura ambiente, no interior de caixas de isopor para o transporte até o local do experimento. Em seguida à chegada ao Laboratório de Ecossistemas Aquáticos (LEA) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna - SP, as embalagens contendo os peixes foram colocadas no interior de uma caixa de polietileno contendo 300 litros de água e mantidas fechadas boiando no interior da mesma para permitir a estabilização da temperatura da água. Após a aclimatação térmica, os peixes foram liberados das embalagens para a caixa d'água, com aeração externa, e mantidos por 2 dias nessas condições. No experimento, foram utilizados 27 animais, todos machos, com peso médio de 193 g ± 45 g (um desvio padrão) e comprimento corporal de 14,5 cm ± 1,4 cm (um desvio padrão).

3.2 Exposição

3.2.1. Hormônio 17β-estradiol

A solução de 17β-estradiol (grau técnico 98%, Sigma) foi preparada em etanol na concentração inicial de 500 µg L⁻¹ (chamada solução-estoque). As demais concentrações de trabalho foram preparadas a partir da diluição dessa solução-estoque.

3.2.2. Desenho Experimental

Após a aclimação no laboratório, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em nove aquários, confeccionados com vidro de espessura 8 mm, nas dimensões de 80x50x50cm (comprimento x largura x altura), com três animais em cada aquário, divididos em grupos de três tratamentos distintos: controle, exposição à concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. As médias de peso e comprimento dos nove peixes de cada tratamento não diferiram estatisticamente entre si, o que garantiu a homogeneidade inicial entre os tratamentos. Os aquários foram abastecidos com 110 litros de água, e alguns parâmetros físico-químicos de qualidade de água foram mantidos sob controle como, por exemplo, temperatura a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, e $\text{pH} = 7,05 \pm 0,16$. No terceiro dia do início da exposição, a água do fundo dos aquários foi sifonada para eliminação dos resíduos de ração e fezes, e o volume de água nos aquários foi mantido em 100 litros. Após sete dias de exposição aos tratamentos, os animais foram sacrificados e dissecados, tendo os fígados e as brânquias coletados e congelados inteiros em gelo seco, e mantidos a -50°C para posterior análise bioquímica.

3.3 Processamento das amostras

Os tecidos coletados foram homogeneizados (1:4, w:v) em tampão Tris 20 mM, EDTA (1mM), DTT (1mM), sacarose (0,5 mM), KCl (0,15 mM), pH 7.5, contendo 1 mM de inibidor de protease (PMSF), e centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos. A fração sobrenadante foi então coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por uma hora a 4°C , de forma a obter as frações citosólicas (sobrenadante) e microsomal, sendo que esta foi ressuspendida em tampão Tris HCl (0,1 mM), EDTA (1mM), DTT (1mM), KCl (0,1 mM), contendo 5% de glicerol, pH 7.5. A atividade da GST foi medida na fração citosólica enquanto que na fração microsomal foi medida a atividade da EROD, PROD e BROD como indicativo de citocromo P450 (CYP1A).

3.4 Avaliação da atividade do Citocromo P450

As atividades enzimáticas foram analisadas segundo a metodologia descrita por Trídico et al. (2010). A atividade de citocromo P450 foi avaliada pela especificidade de três isoformas pelos substratos: Etoxirosorufina-O-desetilase (EROD), Benziloxirosorufina-O-desbenzilase

(BROD) e Pentoxiresorufina-O-despentilase (PROD). Extratos microsomais protéicos do fígado foram avaliados em um espectrofluorímetro por 3 min, na presença do substrato e NADPH, como doador de elétrons, e fosfato de potássio 80 mM (pH 7.4) como tampão de reação. O produto da reação, resorufina, é fluorescente (excitação: 537 nm e emissão: 583nm), e a atividade (pmol minmg de proteína⁻¹) foi calculada com base na curva padrão da resorufina preparada no início das análises. À cubeta foram adicionados 1950 μ L de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7.4), 20 μ L de solução do substrato (7-etoxiresorufina 335 μ M), 20 μ L de NADPH 20 mM e 10 μ L de extrato microsomal. A reação foi observada por 180 s, a 30° C.

3.5 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), utilizando-se a albumina bovina como padrão.

3.6 Avaliação da GST

A atividade da Glutathione S-transferases (GST) foi avaliada pelo método de Keen et al. (1976). A amostra foi adicionada em um meio de reação contendo 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100 mM de glutathione (GSH). O aumento da absorbância foi acompanhado a 340 nm.

3.7 Quantificação de estrógenos nas amostras de água dos sistemas de produção

Amostras de água foram coletadas (30/03/2009) em dois sítios que caracterizam o sistema integrado de produção piscicultura-suinocultura (V-1 e V-2), e um terceiro ponto de coleta (R-1) na água superficial, onde potenciais fontes de contaminantes não foram identificadas na região de Concórdia, SC. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo e transportadas para o Laboratório de Ecologia Química (LEQ) da Embrapa Meio Ambiente. Os procedimentos de extração e clean-up foram adaptados de Rose et al. (2002). As amostras foram centrifugadas e alíquotas de 150mL foram retiradas, com três repetições para cada amostra.

Após esse procedimento acrescentou-se, a cada alíquota, 3 μ g do padrão de etinilestradiol (1mL do padrão de concentração 3 μ g mL⁻¹) e 15 mL

de metanol PA, correspondendo a 10% do volume da amostra. O pH foi ajustado para 3.0 utilizando solução de ácido clorídrico 5M, em seguida as amostras foram extraídas por coluna de fase sólida, em cartucho ODS C18, 200 mg e 3 mL (Accubond, Agilent). O cartucho foi condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água Milli Q pH 3.0. Após a passagem dos 150 mL da amostra de água pelo cartucho, foi feito o clean-up com 5 mL da mistura H₂O (pH 3):MeOH (1:1, v/v) e a secagem durante 5 min, sob vácuo. Após esse tempo, foi procedida a eluição com 5 mL de metanol, sob vácuo. O extrato foi evaporado até a secura, ressuspendido em 300 μ L da mistura utilizada na fase móvel e passado por unidade filtrante de 0,45 μ m de diâmetro de poro.

As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo líquido HP1100, com detector UV-Vis e o gerenciador Chemstation. Os extratos foram separados e analisados por meio da coluna ODS hypersil C18 (4,6mm, 250mm, 5 μ m de tamanho de partícula) e pré-coluna (4,6mm, 12,5mm, 5 μ m de tamanho de partícula) à temperatura ambiente. A fase móvel consistiu de solvente A (metanol/água/ácido fosfórico 65:35:0,2 - v/v/v) e solvente B (metanol 100%). Usou-se o seguinte gradiente linear de fase móvel: 0-20 min, 100% de A; 20-30 min, 90% de A e 10% de B; 30-35 min, 100% de A. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL min⁻¹, e o comprimento de onda de medição de 285 nm. Foram injetadas alíquotas de 10 μ L do extrato para as análises. Nestas condições analíticas, os tempos de retenção para etinilestradiol (padrão externo) e 17 β -estradiol foram de 14,8 e 16,1 min, respectivamente.

4. Resultados e Discussão

As análises químicas por si não possibilitam avaliar o potencial de risco ambiental dos compostos que alcançam o meio ambiente. Dessa forma, as análises de toxicidade já são exigidas por leis ambientais no Brasil. No capítulo IV da Resolução no. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005), referente às condições e padrões de lançamento de efluentes, são estabelecidos nos parágrafos 1 e 2 do artigo 34 que o efluente não deverá causar ou possuir

potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados utilizando organismos aquáticos.

4.1 Indução do CYP450

Diversos estudos tem demonstrado efeitos diversos do E2 em peixes, em função da crescente presença deste hormônio no ambiente decorrente das atividades humanas, o que pode impor certo risco ambiental a estes animais. A maior parte dos estudos centra-se na avaliação de alterações endócrinas classicamente conhecidas desse hormônio nos animais, devido a sua característica estrogênica. Porém, já foi demonstrado também que a exposição de peixes ao E2 pode ser responsável por um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em peixes, evidenciado pelo aumento em níveis de lesões oxidativas à biomoléculas, e alterações na atividade de enzimas de defesa antioxidante (MARIA et al., 2008; THILAGAM et al., 2010). Este aumento pode estar relacionado a alteração nos antioxidantes, diminuindo a capacidade do organismo de combater as ERO, ou ainda via formação de quinonas após sua metabolização, as quais catalisam reações ciclo-redox gerando ERO (SEACAT et al., 1997).

Ainda, sabe-se que o E2 pode ser um importante indutor de tumores em animais, mesmo em baixas concentrações, com esse papel já sido comprovado em peixes como o dourado japonês (COOKE; HINTON, 1999) e truta arco-íris (NUNEZ et al., 1988). Segundo Cooke e Hinton (1999), o E2 foi capaz de promover um aumento significativo da indução de adenomas e carcinomas em peixe dourado quando em combinação com outro composto carcinogênico modelo (dietilnitrosamina), em comparação a animais expostos a este último composto sozinho.

Mais além, o E2 é também conhecido por seu papel inibidor de algumas isoformas do citocromo P450, principalmente da isoforma 1A (NAVAS; SEGNER, 2001), envolvida na biotransformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e bifenilas policloradas, deixando assim os organismos mais vulneráveis à exposição a estes compostos que podem estar presente no ambiente aquático em combinação com o E2. Entretanto, ainda não é bem estudado o conhecimento de quais isoformas

de P450 são induzidas em peixes para a metabolização de hormônios presentes como contaminantes no ambiente. Isto se deve, principalmente, às baixas concentrações nas quais esses compostos são encontrados no ambiente, que só recentemente passaram a chamar a atenção dos pesquisadores, tanto pela potência como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. Dessa forma, neste trabalho, pretendeu-se verificar a sensibilidade de algumas isoformas do P450 em tilápia frente à exposição a 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol, por 7 dias, com o intuito de se ampliar o conhecimento sobre o envolvimento potencial de distintas isoformas do P450 no metabolismo do E2 e, da mesma forma, indicar as enzimas responsivas como potenciais biomarcadoras para estudo de diagnóstico da contaminação ambiental por esse hormônio. Para isso foram testadas três diferentes isoformas: EROD, PROD e BROD.

A mensuração da indução de EROD em peixes é usada como marcador de biotransformação para identificar a exposição dos peixes às substâncias xenobióticas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, as dioxinas e as policlorobifenilas (WHYTE et al., 2000). Segundo estudo de Trídico et al. (2010), benzo-a-pireno (BaP) apresentou forte indução da atividade de EROD (CYP1A) no fígado e o aumento da atividade de GST no fígado e brânquias. Esses mesmos autores observaram que o pesticida diazinon (DZ) não induziu alteração na atividade de EROD, sugerindo que EROD não está relacionada à dessulfuração ou desarilação deste organofosfato. Neste estudo, com o 17 β -estradiol, não se observou diferença estatística nas atividades de EROD entre as concentrações de 17 β -estradiol (comparado ao controle), conforme mostrado na Tabela 2. Esse resultado está de acordo com o que foi notado por Teles et al. (2006), não se observando nenhuma diferença significativa na atividade da EROD após 10 dias de exposição. Ao contrário, outros autores observaram redução na atividade da EROD em peixes expostos ao E2, na fase larval, enquanto que na fase juvenil apenas as doses mais elevadas induziram redução na atividade da EROD após 15 e 30 dias de exposição (THILAGAM et al., 2010). O resultado do presente trabalho pode indicar que o hormônio não exerce indução desta isoforma nos peixes, nas concentrações e tempo de exposição testados.

A Tabela 2 também apresenta a atividade da PROD (2B em mamíferos)

medida nos peixes expostos ao hormônio e nos controles. Pode-se observar que a atividade da PROD mostrou-se significativamente alterada nos dois tratamentos de 17β-estradiol em comparação ao controle, mesmo para o nível de significância mais rigoroso (5%). Se considerarmos um nível de significância um pouco menos exigente (10%), podemos afirmar ainda que o tratamento de maior concentração ($15 \mu\text{g L}^{-1}$), com uma atividade quatro vezes maior que o controle, também resultou em uma maior atividade enzimática quando comparado ao tratamento de menor concentração ($5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Segundo Rocha (2004), é difícil determinar a participação da subfamília CYP2B na ativação metabólica de xenobióticos e na carcinogênese química devido a grande variedade de xenobióticos que esta pode metabolizar, como pesticidas halogenados, agentes farmacêuticos, hormônios endógenos, substâncias produzidas por plantas, hidrocarbonetos voláteis como cetonas, xilenos e piridina, e várias bifenilas poli-halogenadas.

Tabela 2. Atividade das enzimas EROD, BROD e PROD em tilápias expostas a duas concentrações de 17β-estradiol.

Tratamento	Valores médios ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$)*		
	EROD	PROD	BROD
$15 \mu\text{g L}^{-1}$	4,212 a A	5,506 a A	14,351 a A
$5 \mu\text{g L}^{-1}$	1,536 a A	3,600 a B	19,796 a A
Controle	1,460 a A	1,145 b C	6,427 b B

*Médias na vertical, de 9 repetições em cada tratamento, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% (minúscula) ou 10% (maiúscula).

Em mamíferos, verificou-se que a testosterona, que é hidroxilada na posição 16-β, é considerada um substrato de alta especificidade para a ação catalítica de CYP2B (HUBER et al., 2008). Por outro lado, ainda não existem estudos similares em peixes. Assim, no presente trabalho, os resultados obtidos para esta enzima podem indicar um papel importante da mesma no metabolismo do 17β-estradiol presente na água. É importante

salientar que a indução da PROD ocorreu de forma significativa, mesmo em concentrações muito baixas do hormônio, reforçando sua utilidade e sensibilidade como potencial biomarcadora da presença deste composto na água.

Com relação à atividade da BROD, podemos notar que houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o controle e os dois grupos tratados com o 17 β -estradiol. Entre as duas concentrações, embora haja uma diferença numérica e até o resultado da menor concentração seja superior ao da maior, não foi possível determinar a significância estatística nos níveis testados, de 5 e 10% (Tabela 2).

Conforme mencionado anteriormente, uma mesma molécula pode se tornar substrato para várias isoenzimas do citocromo P450, de modo que duas ou mais isoformas de CYP podem contribuir para o metabolismo de um único composto. Isso justifica o fato da BROD também ter mostrado alterações nos diferentes tratamentos, mostrando maior sensibilidade ao composto. Portanto, também pode ser considerada como potencial biomarcador da presença do 17 β -estradiol em águas superficiais, mesmo em pequenas concentrações.

4.2 Indução da GST

As Glutationas S-Transferases (GSTs) são um grupo de enzimas que apresentam especificidades comuns em relação ao substrato aceptor eletrofílico. Considerada a principal enzima detoxificante da fase II, desempenha papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos, bem como na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER et al., 2008). Com base neste contexto, pretendeu-se verificar a sensibilidade da GST nos peixes frente à exposição a 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol por 7 dias. A Tabela 3 apresenta os resultados da análise da atividade da GST em brânquias e fígados das tilápias expostas ao hormônio por sete dias.

Tabela 3. Atividade da Glutathione S-transferases (GST) no fígado e brânquias de tilápias-do-Nilo expostas a duas concentrações de 17 β -estradiol.

Tratamento	Valores médios (U mg ⁻¹ de proteína)*	
	GST (fígados)	GST (brânquias)
15 $\mu\text{g L}^{-1}$	10,164 a A	8,295 a A
5 $\mu\text{g L}^{-1}$	10,114 a A	8,865 a A
Controle	8,719 a B	7,945 a A

*Médias na vertical, de 9 repetições em cada tratamento, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% (minúscula) ou 10% (maiúscula).

A análise de variância do experimento confirmou a existência de efeito significativo do 17 β -estradiol sobre a atividade enzimática (GST) nos fígados dos peixes, com grau de significância superior a 90% (Prob > F = 0,0753), conforme pode ser observado na Tabela 3. Ao aplicar o teste de médias, o resultado permitiu afirmar que no fígado, com 90% de confiança, a atividade enzimática nos tratamentos com 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ assumiram valores superiores aos do controle, mas não diferentes entre si. No caso das brânquias, como também pode ser visto na Tabela 3, o teste de F para a análise de variância do experimento sugere um efeito menos significativo, inferior a 80% (Prob > F = 0,2313), nível normalmente considerado baixo para que permita afirmar com convicção que as diferenças observadas se devem aos tratamentos empregados. Consequentemente, para a atividade enzimática (GST) nas brânquias dos peixes, não houve significância estatística na comparação entre as médias dos tratamentos, nos níveis testados (5 e 10%) (Tabela 3).

Além disso, foi possível observar que os valores das atividades enzimáticas das brânquias e fígados dos peixes-controle e tratados seguem uma tendência: a atividade enzimática das brânquias aumenta proporcionalmente às atividades do fígado (Figura 2).

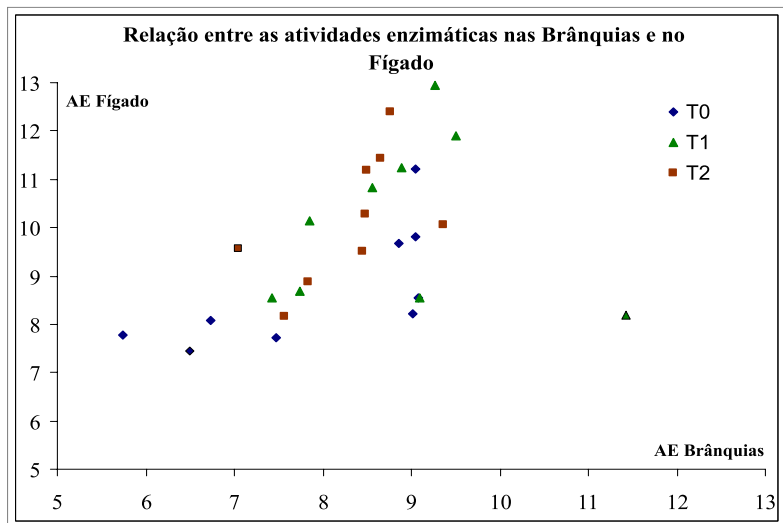


Figura 2. Relação entre as atividades enzimáticas (AE) nas brânquias e nos fígados dos peixes nos três tratamentos: T0 = Controle; T1 = 5 µg L⁻¹; e T2 = 15 µg L⁻¹.

Isto pode ter sido causado pela administração de baixas concentrações do hormônio, que não foram suficientes para induzir grande produção durante o metabolismo de fase I. Deste modo, é possível que a GST em níveis basais nas tilápias possa detoxificar o produto sem necessidade de grandes aumentos de expressão. Concordante com essa idéia, Hughes e Gallagher (2004) demonstraram que em peixes da espécie *Micropterus salmoides* expostos ao E2, não apresentaram alteração na expressão de RNA mensageiro para GSTs, porém tiveram a atividade dessas enzimas significativamente aumentadas.

4.3 Quantificação de 17 β -estradiol e estrona nas amostras de campo

O 17 β -estradiol esteve presente em concentrações quantificáveis nos três pontos (V-1, V-2 e R-1) amostrados, sendo estes valores de 1.300; 2.200 e 1.560 ng L⁻¹, respectivamente (Tabela 4). Essas concentrações estão dentro das concentrações encontradas em outras localidades do Brasil (GHISELLI, 2006; SODRÉ et al., 2007; LOPES et al. 2010) (Tabela 4). Porém, estes valores estão muito acima da

concentração mínima a apresentar efeito observável (LOEL = “lowest observable effect level”), de 10 ng L⁻¹, estabelecida por Barel-Cohen et al. (2006) para estradiol e estrona. Estes mesmos autores atribuem como provável causa para as variações nas concentrações encontradas em águas superficiais, o volume de água no corpo receptor (seca ou chuva) e a sua vazão.

Tabela 4. Concentrações de estrógenos encontradas neste estudo e em outros estudos realizados no Brasil.

Estrógeno	Local de coleta				Origem dos dados
	Água superficial	Nascente	Água tratada	Viveiro	
17β-estradiol (ng L ⁻¹)	1.560	-	-	1.300-2.200	Este estudo
	8,6-25,8	16,0-30,6	6,8	-	Lopes et al. (2010)
	-	1.900-6.000	2.100-2.600	-	Ghiselli (2006)
	38-2.510	-	-	-	Sodré et al. (2007)
Estrona (ng L ⁻¹)	< L.D.*	-	-	< L.D.*	Este estudo
	600	< 600	-	-	Lopes et al. (2010)
	-	3.500-5.000	-	-	Ghiselli (2006)

* limite de detecção do método

Portanto, devem ser realizados estudos complementares com coletas em épocas diversas e outras fases de desenvolvimento dos peixes. As informações obtidas com testes em laboratório são difíceis de serem extrapoladas para o ambiente, uma vez que o ambiente aquático está sujeito a diversos processos bióticos e abióticos que não são reproduzidos no laboratório; porém, os testes são imprescindíveis para a predição dos possíveis efeitos desses compostos sobre os componentes

do ambiente. E, para tanto, serão necessários outros experimentos de exposição, utilizando diferentes concentrações de hormônio, ou alterando o período de exposição, ou mesmo a pré-exposição a outras substâncias.

5. Conclusão e Recomendação

1. A exposição de tilápias a concentrações de 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol mostraram que esse produto é capaz de induzir modificações nas atividades das enzimas BROD, PROD e GST (fígados), sendo que estas respostas podem ser consideradas potenciais indicadoras de exposição da tilápia ao hormônio 17 β -estradiol, em níveis semelhantes aos encontrados em águas superficiais, verificados por outros autores (GHISELLI, 2006; SODRÉ et al., 2007).

2. A atividade da Glutathione s-transferase (GST) foi significativamente maior no fígado dos animais tratados com o hormônio. Por outro lado, o hormônio não exerce indução da isoforma 1A nos peixes, na concentração e no tempo de exposição testados.

3. As informações sobre os níveis de hormônios em ambientes naturais ainda são escassas na literatura brasileira, bem como seus efeitos em peixes. As concentrações encontradas em águas de viveiros foram cerca de dez vezes menores que a utilizada neste experimento de exposição (5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), mas é preciso estar atento às concentrações encontradas porque estas foram muito maiores que o valor mínimo que apresenta algum efeito biológico, estimado por Barel-Cohen et al. (2006). Diante disso, mais experimentos dessa natureza serão realizados pela equipe da Embrapa Meio Ambiente e seus parceiros para confirmar os resultados encontrados no presente estudo.

4. Caso os resultados venham a ser confirmados, uma possível readequação no atual sistema de produção, por exemplo, por meio de redução da carga orgânica nos viveiros, poderá ser necessária.

6. Agradecimento

Agradecemos a Dagmar Nunes dos Santos Oliveira (Assistente A) e Melissa Baccan (Analista B), pelo apoio na condução do experimento e nas análises químicas; à estagiária Franciele Curioletti pelo apoio na coleta de campo; ao CNPq e à Embrapa (Projeto Aquabrazil) pelo suporte financeiro.

Referências

AZEVEDO, T. M. P. de; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. de. Haematological and gill responses in parasitised tilapia from Valley of Tijucas River, SC, Brazil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 2, p. 115-120, mar./apr. 2006.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BAREL-COHEN, K.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.; KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in polluted river. **Journal of Environmental Management**, London, v. 78, n. 1, p. 16–23, 2006.

BOSCARDIN, N. R. A produção aquícola Brasileira. In: OSTRENSKY, A; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Ed.) **Aqüicultura no Brasil, o desafio é crescer**. Brasília, 2008, 276p.

BOSCOLOL, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, M.; MEUER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e 36 de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.

BOYD, C. E.; LIM, C.; QUEIROZ J.; SALIE, K.; DE WET, L.; MCNEVIN, A. Best management practices for responsible aquaculture. In: **USAID/ Aquaculture Collaborative Research Support Program**. Corvallis, Oregon State University, 2008. 47 p.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science & Technology**, Boca Raton, v. 25, n. 3, p. 201-268, 1995.

CECCARELLI, P. S.; FIGUEIRA, L. B. Aqüicultura integrada: possíveis problemas de saúde devido ao uso de excretas na aqüicultura. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 63, p. 38-40, 2001.

COMMANDEUR, J. N. M., STIJNTJES, G. J., VERMEULEN, N. P. E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 271-330, 1995.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA: n° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 mar. 2005.

COOKE, J. B.; HINTON, D. E. Promotion by 17 beta-estradiol and beta-hexachlorocyclohexane of hepatocellular tumors in medaka, *Oryzias latipes*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 45, n. 2-3, 127-145, 1999.

EL-SHAFI, S. A., GIJZEN, H. J., NASR, F. A., EL-GOHARY, F. A. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. **Environmental Research**, San Diego, v. 95, n.2, p. 231-238, 2004.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. 60 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, SP.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOLD-BOUCHOT, G., ZAPTA-PEREZ, O., RODRIGUEZ-FUENTES, G., CEJA-MORENO, V., RIO-GARCIA, M. D., CHAN-COCOM, E. Biomarkers and pollutants in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in four lakes from San Miguel, Chiapas, Mexico. **International Journal of Environment & Pollution**, Geneva, v. 26, n. 1/2/3, p. 129-141, 2006.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. de. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUGHES, E. M.; GALLAGHER, E. P. Effects of 17-beta estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 137, p. 237-247, 2004.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations of their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 256, n. 2-3, p.163-173, 2000.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

MARIA, V.L.; AHMAD, I.; SANTOS, M.A. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) DNA strand breaks and lipid peroxidation response following 17beta-estradiol two mode of exposures. **Environment International**, New York, v. 34, p. 23-29, 2008.

MULDER, G. J.; COUGHTY, M. W. H.; BURCHELL, B. Glucuronidation. In: Mulder, G.J. (Ed.) **Conjugation Reactions in Drug Metabolism; an Integrated Approach**. London: Taylor and Francis, 1990. 413p.

NAVAS, J. M.; SEGNER, H. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 138, p. 285-298, 2001.

NUNEZ, O.; HENDRICKS, J. D.; BAILEY, G. S. Enhancement of aflatoxin B1 and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine hepatocarcinogenesis in rainbow trout *Salmo gairdneri* by 17-B-estradiol and other organic chemicals. **Diseases of Aquatic Organisms**, Victoria, v. 5, p. 185-196, 1988.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. **Piscicultura**: fundamentos e técnicas de manejo. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211 p.

PALHARES, J. C. P. Criação Integrada entre Piscicultura e Suinocultura. ANAIS, V SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, 5., Florianópolis, 2006. **Anais...** Florianópolis, 2006. p. 15-26.

PATHIRATNE, A., CHANDRASEKERA, L. W. H. U., PATHIRATNE, K. A. S. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, Holanda, v. 156, n. 1-4, p. 361-375, 2009.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

ROCHA, D. A .M. **Alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos na fase inicial da esquistossomose *Mansonica murina***. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.

ROSE, J.; HOLBECH, H.; LINDHOLST, C.; NORUM, U.; POVLSEN, A.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C Toxicology Pharmacology, New York, v. 131, n. 4, p. 531-539, 2002.

SEACAT, A. M.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J. L.; YAGER, L. D. ESR identification of free radicals formed from the oxidation of catechol estrogens by Cu²⁺ +. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 347, p. 45-52, 1997.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Curitiba, v. 2, p. 187-196, 2007.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, stress and genotoxic effects of 17 β -estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Environment International**, New York, v. 32, n. 4, p. 470–477, 2006.

THILAGAM, H.; GOPALAKRISHNAN, S.; QU, H-D.; BO, J.; WANG, K-J. 17 β -estradiol induced ROS generation, DNA damage and enzymatic responses in the hepatic tissue of Japanese sea bass. **Ecotoxicology**, Oak Ridge, v. 19, p. 1258-1267, 2010.

TRÍDICO, C. P.; RODRIGUES, A. C. F.; NOGUEIRA, L.; SILVA, D. C.; MOREIRA, A. B.; ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 5, p. 858-863, 2010.

VALENTI, W. C. Aquicultura Sustentável. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA, 12., 2002, Portugal. **Anais...**, p. 111-118.

WHYTE, J. J.; JUNG, R. E.; SCHMITT, C. J.; TILLITT, D. R. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Review in Toxicology**, Albuquerque, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.



Meio Ambiente

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

